

Rec'd PCT/PTO in 2 SEP 2003

CT/JP03/03044

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

14.03.03

#4

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 3月14日

出願番号

Application Number:

特願2002-070996

[ST.10/C]:

[JP2002-070996]

REC'D 09 MAY 2003

WIPO

PCT

出願人

Applicant(s):

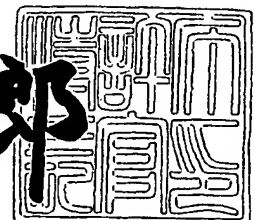
独立行政法人産業技術総合研究所
株式会社ジェー・ジー・エス

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3028907

【書類名】 特許願

【整理番号】 01742

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

 【氏名】 成松 久

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

 【氏名】 稲葉 二郎

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

 【氏名】 梅谷内 晶

【特許出願人】

 【識別番号】 301021533

 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【特許出願人】

 【識別番号】 501029744

 【氏名又は名称】 株式会社ジェー・ジー・エス

【代理人】

 【識別番号】 100088546

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 谷川 英次郎

 【電話番号】 03(3238)9182

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 053235

【納付金額】

21,000円

【その他】

国等以外の全ての者の持分の割合 50/100

国等の委託研究の成果に係わる特
許出願（平成13年度新エネルギー・産業技術総合開発
機構 糖鎖合成関連遺伝子ライブラリーの構築 委
託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受け
るもの）

【提出物件の目録】

【物件名】

明細書 1

【物件名】

要約書 1

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規N-アセチルグルコサミン転移酵素及びそれをコードする核酸

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に1若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ配列を有し、Gal β 1-4GlcまたはGal β 1-4GlcNAc-基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを β -1,3結合で転移する活性を有するタンパク質。

【請求項2】 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列又は該アミノ配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に1若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ配列を有する請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】 前記タンパク質は、配列番号1又は2に示されるアミノ酸配列と70%以上の相同性を有する請求項1又は2記載のタンパク質。

【請求項4】 前記タンパク質は、配列番号1又は2に示されるアミノ酸配列と90%以上の相同性を有する請求項3記載のタンパク質。

【請求項5】 前記タンパク質は、配列番号2に示されるアミノ酸配列又は該配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に1若しくは数個のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ配列を有する請求項4記載のタンパク質。

【請求項6】 前記タンパク質は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する請求項5記載のタンパク質。

【請求項7】 請求項1ないし6のいずれか1項に記載のアミノ酸配列を有する領域を含み、Gal β 1-4GlcまたはGal β 1-4GlcNAc-基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを β -1,3結合で転移する活性を有するタンパク質。

【請求項8】 請求項1ないし7のいずれか1項に記載のタンパク質をコードする核酸。

【請求項9】 配列表の配列番号2又は4に示される塩基配列とストリンジ

ェントな条件下でハイブリダイズする、請求項 8 記載の核酸。

【請求項 10】 配列表の配列番号 2 又は 4 に示される塩基配列を有する請求項 9 記載の核酸。

【請求項 11】 請求項 8 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の核酸を含み、宿主細胞中で該核酸を発現することができる組換えベクター。

【請求項 12】 請求項 8 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の核酸が導入され、該核酸を発現する細胞。

【請求項 13】 請求項 8 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の核酸と特異的にハイブリダイズする、該核酸の測定用核酸。

【請求項 14】 請求項 10 記載の領域中の部分領域と相補的な配列を有する請求項 13 記載の測定用核酸。

【請求項 15】 プローブ又はプライマーである請求項 13 又は 14 記載の測定用核酸。

【請求項 16】 塩基数が 15 塩基以上である請求項 15 記載の測定用核酸。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、Gal β 1-4 Glc または Gal β 1-4 GlcNAc-基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを β -1,3結合で転移する活性を有する新規な酵素及びそれをコードする核酸、並びに該核酸を測定するための核酸に関する。

【0002】

【従来の技術】

Gal β 1-4 Glc または Gal β 1-4 GlcNAc-基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを β -1,3結合で転移する活性を有する、ポリラクトサミン糖鎖の合成に関与する活性を有する酵素は、現在までに 5 種類同定されている (Togayachi, A.等, J Biol Chem, 2001, 276, 22032-40, Shiraishi, N.等, J Biol Chem, 2001, 276, 3498-507, Sasaki, K等, Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94, 14294-9)。しかし、これらの遺伝子を細胞に発現させるとポリラクトサミンが細胞表

面に増加するが、発現酵素にするとその活性は非常に弱いものも存在する。すなわち、ポリラクトサミンを作る酵素は、それぞれ違った特徴を備えていると考えられるが、未だこの酵素の特徴付けは十分ではない。従って、この酵素活性を必要とするポリラクトサミン糖鎖構造の作製または製造は、化学合成するか、生体成分より分離するか、または、酵素学的に組織ホモジネートを使用して合成しなければならない。

【0003】

ポリラクトサミン糖鎖を基幹とする糖鎖構造上にはルイス抗原などの糖鎖構造があることが知られている (Kannagi R. Glycoconj J. 1997 Aug;14(5):577-84. Review; Nishihara S et al., J Biol Chem. 1994 Nov 18;269(46):29271-8)。同様にポリラクトサミン糖鎖の長さなどの構造が癌転移、NK細胞などをはじめとした細胞免疫機能に関係していると言われている (Ohyama C et al., EMBO J. 1999 Mar 15;18(6):1516-25.)。同様にヘリコバクターピロリ菌はルイス抗原などの関連糖鎖を介してヒト胃組織に感染することが知られている (Wang G et al., Mol Microbiol. 2000 Jun;36(6):1187-96. Review; Falk PG et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Feb 28;92(5):1515-9)。従って、もし、Gal β 1-4Glc またはGal β 1-4GlcNAc-基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを β -1,3結合で転移する活性を有する酵素遺伝子をクローニングでき、また、該遺伝子を利用して遺伝子工学的に該酵素を生産できるようになれば、該酵素に対する抗体も生産可能となる。従って、これらは癌、免疫病及びピロリ菌感染症の診断、治療及び予防に有用である。しかしながら、該酵素は、未だ精製分離もされておらず、該酵素の単離及び遺伝子の同定についての手がかりはない。そのために、該酵素に対する抗体も作製されていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、Gal β 1-4GlcまたはGal β 1-4GlcNAc-基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを β -1,3結合で転移する活性を有する酵素及びそれをコードする核酸を提供することである。また、本発明の目的は、該核酸を宿主細胞内で発現する組換えベクター及び該核酸が導入され、前記核酸および酵

素タンパク質を発現する細胞および酵素タンパク質を提供することである。さらに、本発明の目的は、上記本発明の核酸を測定するための測定用核酸を提供することおよび活性を有する該酵素の生産法を提供するものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

上記の通り、目的とする酵素は、未だ単離されていないので、その部分アミノ酸配列を知ることもできない。一般に、細胞に微量しか含まれていないタンパク質を単離精製することは容易ではなく、現在に至るまで単離されていない酵素を細胞から単離することは容易でないことが予想される。本願発明者は、目的とする酵素と比較的類似した作用を有する種々の酵素遺伝子の塩基配列間に、もしも相同性の高い領域が存在していれば、目的とする酵素の遺伝子もその相同配列を有しているかもしれないと考えた。そして、公知の β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子、 β 1, 3-ガラクトース転移酵素および β 1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素遺伝子等の塩基配列を検索した結果、相同な領域が見つかった。そこで、この相同領域にプライマーを設定してcDNAライブラリーからPCRでクローニングすることを基本として種々検討した結果、該酵素の遺伝子のクローニングに成功し、その塩基配列及び推定アミノ酸配列を決定することができ、本発明に至った。

【0006】

すなわち、本発明は、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に1若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ配列を有し、Gal β 1-4GlcまたはGal β 1-4GlcNAc-基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを β -1,3結合で転移する活性を有するタンパク質を提供する。また、本発明は、該タンパク質をコードする核酸を提供する。さらに、本発明は、該核酸を含み、宿主細胞中で該核酸を発現することができる組換えベクターを提供する。さらに、本発明は、該組換えベクターにより形質転換され、前記核酸を発現する細胞を提供する。さらに、本発明は、核酸と特異的にハイブリダイズする、該核酸の測定用核酸を提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】

下記実施例において詳述する方法により、ヒト幽門洞(antrum) cDNAライブラリーからクローニングされた、本発明のタンパク質をコードする核酸から開始コドン(ATG)を除いた核酸は、配列表の配列番号4に示される塩基配列を有し、それがコードする推定アミノ酸配列が、該塩基配列の下に記載されている。配列番号3には、該アミノ酸配列のみを取り出して示す。配列番号4に示される塩基配列を有する核酸は、下記実施例において、発現ベクターに組み込まれ、昆虫細胞中で発現され、実際に、上記酵素活性を有するタンパク質が生産されることが確認されている。配列番号3に示されるアミノ酸配列と、他の類似の酵素(具体的な酵素名: β -1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子のbeta3GnT2: AB049584)のアミノ酸配列とを比較、検討した結果、比較的同源性の高い領域、すなわち、配列番号3に示されるアミノ酸配列中の第45番目のアミノ酸からC末端までの領域が酵素活性ドメインであると考えられ、この283アミノ酸から成る領域が含まれていれば上記酵素活性が発揮されると考えられる。この283アミノ酸を取り出して配列番号1に示し、また、これをコードする核酸を配列番号4から取り出して配列番号2に示す。

【0008】

下記実施例で得られた本発明のタンパク質(「beta3GnT-7」と命名)は、次の性質を有する酵素である。なお、各性質及びその測定方法は下記実施例において詳述されている。

作用: Gal β 1-4 GlcまたはGal β 1-4 GlcNAc-基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを β -1,3結合で転移する。触媒する反応を反応式で記載するとUDP-N-アセチル-D-グルコサミン+ β -D-ガラクトシル-1,4-D-グルコシル-R

→ UDP + N-アセチル- β -D-グルコサミニル-1,3- β -D-ガラクトシル-1,4-D-グルコシル-R、または、UDP-N-アセチル-D-グルコサミン+ β -D-ガラクトシル-1,4-N-アセチル-D-グルコサミニル-R

→ UDP + N-アセチル- β -D-グルコサミニル-1,3- β -D-ガラクトシル-1,4-N-アセチル-D-グルコサミニル-R

基質特異性： Gal β 1-4 Glc または Gal β 1-4 GlcNAc-基。生体物質では、例えば、糖蛋白質（O-グリカン、N-グリカン）や糖脂質（ラクト・ネオラクト系列糖鎖など）上のポリラクトサミン構造を始めとして多数存在しており、またプロテオグリカン（ケラタン硫酸）などの基幹構造等に含まれる Gal β 1-4 Glc または Gal β 1-4 GlcNAc-基。

【0009】

なお、一般に、酵素のような生理活性を有するタンパク質において、そのアミノ酸配列のうち、1若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に1若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加された場合であっても、該生理活性が維持されることがあることは周知である。従って、配列番号1又は3に示されるアミノ配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に1若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ配列を有し、Gal β 1-4 Glc または Gal β 1-4 GlcNAc-基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを β -1,3結合で転移する活性を有するタンパク質（以下、便宜的に「修飾タンパク質」）も本発明の範囲に含まれる。このような修飾タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号1又は3に示されるアミノ酸配列と70%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有することが好ましい。なお、アミノ酸配列の相同性は、FASTAのような周知のコンピューターソフトを用いて容易に算出することができ、このようなソフトはインターネットによっても利用に供されている。さらに、該修飾タンパク質としては、配列番号1又は3に示されるアミノ酸配列又は該配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に1若しくは数個のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ配列を有するものが特に好ましい。さらに、配列番号1若しくは3に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質又はこれらの修飾タンパク質を含むタンパク質であって、Gal β 1-4 Glc または Gal β 1-4 GlcNAc-基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを β -1,3結合で転移する活性を有するタンパク質も当然、本発明の範囲に含まれる。例えば、下記実施例では、配列番号3に示されるアミノ酸配列の上流に、膜貫通領域を含む領域が結合された、膜結合型の酵素をコードする核酸もクローニング

されたが、このような膜結合型の酵素も当然本発明の範囲に含まれる。

【0010】

本発明は、配列番号1又は配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする核酸及び上記修飾タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸も提供する。核酸としてはDNAが好ましい。なお、周知の通り、コドンには縮重があり、1つのアミノ酸をコードする塩基配列が複数存在するアミノ酸もあるが、上記アミノ酸配列をコードする塩基配列であれば、いずれの塩基配列を有するものも本願発明の範囲に含まれる。なお、下記実施例において実際にクローニングされたcDNAの塩基配列が配列番号2および配列番号4に示されている。配列番号2又は配列番号4に示す塩基配列を有する核酸とストリンジントな条件下(すなわち、5 x Denhardt's reagent, 6 x SSC, 0.5% SDS又は0.1% SDSといった一般的なハイブリダイゼーション溶液を用いて50～65℃で反応を行なう)において、ハイブリダイズし、かつ、上記修飾タンパク質をコードする核酸も本発明の範囲内に入る。

【0011】

上記本発明の核酸は、下記実施例に詳述する方法により調製することもできるし、また、本発明によりその塩基配列が明らかにされたので、下記実施例で用いているヒト幽門洞を材料として用い、常法であるRT-PCR法を行うことにより容易に調製することができる。また、上記本発明のタンパク質は、例えば下記実施例に詳述するように、上記本発明の核酸を発現ベクターに組み込み、宿主細胞中で発現させ、精製することにより容易に調製することができる。

【0012】

上記本発明の核酸を、発現ベクターのクローニング部位に挿入することにより、宿主細胞中で上記核酸を発現させることができる組換えベクターを得ることができる。発現ベクターとしては、種々の宿主細胞用の種々のプラスミドベクター及びウイルスベクターが周知であり、市販もされている。本発明では、このような市販の発現ベクターを好ましく用いることができる。また、このような組換えベクターで宿主細胞を形質転換又は形質導入する方法も周知である。本発明はまた、該核酸が形質転換、形質導入又はトランスフェクション等により宿主細胞に

導入され、該核酸を発現する細胞を提供する。宿主細胞に外来遺伝子を導入する方法自体は周知であり、上記組換えベクターを用いること等により容易に行うことができる。宿主細胞としては、特に限定されず、哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母、細菌等を用いることができる。なお、組換えベクターの構築及びそれを用いて本発明の核酸を宿主細胞に導入する方法の具体例が下記実施例に詳述されている。

【0013】

なお、本発明のタンパク質は、そのアミノ酸配列が上記した通りのものであり、上記した酵素活性を有するものであれば、タンパク質に糖鎖が結合していてもよい。すなわち、本発明の「タンパク質」は「糖タンパク質」をも包含する。

【0014】

本発明により、本発明の新規酵素の cDNA の塩基配列が明らかになったので、該酵素の mRNA 又は cDNA と特異的にハイブリダイズする、前記本発明の測定用核酸（以下、単に「測定用核酸」）が本発明により提供された。ここで、「特異的」とは、検査対象となる細胞中に存在する他の核酸とハイブリダイズせず、上記本発明の核酸とのみハイブリダイズするという意味である。測定用核酸は、上記本発明の核酸、とりわけ配列番号 2 又は 4 に示される塩基配列を有する核酸中の部分領域と相同的な配列を有することが一般的に好ましいが、1～2 塩基程度の不一致があっても差し支えないことが多い。測定用核酸は、プローブ又は核酸増幅法におけるプライマーとして用いることができる。特異性を確保するために、測定用核酸の塩基数は 15 塩基以上、さらに好ましくは 18 塩基以上である。サイズは、プローブとして用いる場合には、15 塩基以上、さらに好ましくは 20 塩基以上、コード領域の全長以下が好ましく、プライマーとして用いる場合には、15 塩基以上、さらに好ましくは 18 塩基以上、50 塩基以下が好ましい。被検核酸の部分領域と相補的な配列を有する核酸を PCR のような遺伝子増幅法のプライマー、又はプローブとして用いて被検核酸を測定する方法自体は周知であり、下記実施例には、ヒト細胞中の本発明の酵素の mRNA をノーザンブロット及びインサイチュハイブリダイゼーションにより測定した方法が具体的に詳述されている。なお、本明細書において、「測定」には、検出、定量、半

定量のいずれもが包含される。

【0015】

PCRのような核酸増幅法自体は、この分野において周知であり、そのための試薬キット及び装置も市販されているので容易に行うことができる。上記した本発明の測定用核酸の一对をプライマーとして用い、被検核酸を鋳型として用いて核酸増幅法を行うと、被検核酸が増幅されるのに対し、検体中に被検核酸が含まれない場合には増幅が起きないので、増幅産物を検出することにより検体中に被検核酸が存在するか否かを知ることができる。増幅産物の検出は、増幅後の反応溶液を電気泳動し、バンドをエチジウムブロミド等で染色する方法や、電気泳動後の増幅産物をナイロン膜等の固相に不動化し、被検核酸と特異的にハイブリダイズする標識プローブとハイブリダイズさせ、洗浄後、該標識を検出することにより行うことができる。また、クエンチャー蛍光色素とレポーター蛍光色素を用いたいわゆるリアルタイム検出PCRを行うことにより、検体中の被検核酸の量を定量することも可能である。なお、リアルタイム検出PCR用のキットも市販されているので、容易に行うことができる。さらに、電気泳動バンドの強度に基づいて被検核酸を半定量することも可能である。なお、被検核酸は、mRNAでも、mRNAから逆転写したcDNAであってもよい。被検核酸としてmRNAを増幅する場合には、上記一对のプライマーを用いたNASBA法(3SR法、TMA法)を採用することもできる。NASBA法自体は周知であり、そのためのキットも市販されているので、上記一对のプライマーを用いて容易に実施することができる。

【0016】

プローブとしては、上記測定用核酸に蛍光標識、放射標識、ビオチン標識等の標識を付した標識プローブを用いることができる。被検核酸又はその増幅物を固相化し、標識プローブとハイブリダイズさせ、洗浄後、固相に結合された標識を測定することにより、検体中に被検核酸が存在するか否かを調べることができる。あるいは、測定用核酸を固相化し、被検核酸をハイブリダイズさせ、固相に結合した被検核酸を標識プローブ等で検出することも可能である。このような場合、固相に結合した測定用核酸もプローブと呼ばれる。

【0017】

本発明の酵素を、Gal β 1-4 GlcまたはGal β 1-4 GlcNAc-基を有する糖タンパク質、オリゴ糖、糖脂質又は多糖等に作用させることにより、Gal β 1-4 GlcまたはGal β 1-4 GlcNAc-基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンが β -1,3結合で結合される。従って、本発明の酵素は、糖タンパク質の糖鎖の修飾、糖脂質の糖鎖の修飾や、糖類の合成に用いることができる。さらに、この酵素を免疫原として動物に投与することにより、該酵素に対する抗体を作製することができ、該抗体を用いて免疫測定法により該酵素を測定することが可能になる。従って、本発明の酵素及びこれをコードする核酸は、このような免疫原の作製に有用である。このような抗体及び上記した測定用核酸は、生体中の該酵素を測定することに有用であり、該測定は、癌、免疫病及びピロリ菌感染症の診断、治療及び予防に有用である。

【0018】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、下記の記述において、例えば配列表の配列番号5で表される塩基配列を有する核酸を、便宜的に「配列番号5」のように記載することがある）。

【0019】

1. 遺伝子データベースの検索とbeta3GnT-7の塩基配列決定

既存の β -1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子、 β -1, 3-ガラクトース転移酵素および β -1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素遺伝子を用いて、遺伝子データベースから類似遺伝子の検索を行った。用いた配列は β -1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子AB049584、AB049585、AB049586、AB045278、 β 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の配列AF117222、Y15060、Y15014、AB026730、AF145784、AF145784、1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素遺伝子の配列Y15062（すべてGene Bank登録番号）で、プログラムはBLASTのtBlastnを使用し、ORF（Open Reading Frame）に相当するアミノ酸全てについて検索を行った。

【0020】

その結果、EST配列Gene Bank Accetion No.AK000770とヒトゲノム配列Gene Bank accetion No.AC017104が見出された。そこでAC017104を用いてライブラリーのスクリーニングを行った。

【0021】

用いたサンプルは常法 (Yuzuru Ikehara , Hisashi Narimatsu et al, Glycobiology vol. 9 no. 11 pp. 1213-1224, 1999) により作製したヒトAntrum (幽門洞) cDNAライブラリーである。また、スクリーニング手法はラジオアイソトープを使用した一般的な核酸プローブによる方法を用いた。具体的には以下に述べるとおりである。

【0022】

まず、ヒトAntrum (幽門洞) cDNAライブラリーより常法に従って調製したラムダファージを鋳型とし、プライマーCB-635 (5' -cagca gctgc tggcc tacga agac- 3') (AC017104における塩基番号6814-6837)とCB-638 (5' -gcaca tgccc aga aa gacgt cgtc- 3') (塩基番号7221-7245)を用いてPCRを行い、増幅したDNA断片約430 bpをAmersham社製Multiple DNA labeling systemを用いて³²P-dCTPで放射能ラベルした。

【0023】

このプローブを用いて、大腸菌上に形成されたラムダファージのプラークのうち、プローブとハイブリダイゼーションする単一のプラークを拾い、上記プライマーCB635とCB638を用いてPCRで目的とするDNA部位の存在を確認した。挿入が確認されたプラークより得られたファージはLamda ZAP IIベクター (ストラタジーン社) で構築されているため (Yuzuru Ikehara , Hisashi Narimatsu et al, Glycobiology vol. 9 no. 11 pp. 1213-1224, 1999) 、付属の説明書に従った方法によりpBluescript SKベクターに挿入されたcDNAクローンとして調製 (Excision) することが出来る。同方法によりこれを調製し、得られたコロニーよりDNAを得た。その後、通常の方法に従ってcDNAクローンの塩基配列を決定した (配列番号6) 。

【0024】

上記方法で得られた配列番号6はAC017104の塩基番号4828から7052に該当し、

ORFの3'側が欠けていたため、3'側をcDNAからPCRでクローニングしてつなげる
 こととした。即ち、コンピューターによる検索結果のAC017104より予想される配
 列から終止コドンの後の配列でプライマーCB-625 (5'-cgttc ctggg cctca gtttc
 ctag-3') (塩基番号7638-7661) を設計し、上記CB635と組み合わせて上記ヒ
 トAntrum (幽門洞) cDNAライブラリーよりDNA断片を得た。常法によりこのDNA
 断片の塩基配列を決定したところ、配列番号7 (AC017104における6814-7661)
 (以下配列3という) が得られた。これを配列番号2と組み合わせ、理論上のO
 R F 987bp (AC017104における6466-7452) が得られ、このORFから328アミノ
 酸が推定されbeta3GnT-7と名づけた (配列番号8)。一般的には、糖転移酵素は
 2型の膜1回貫通タンパクであることが知られているが、このORF配列には、N末
 端には疎水性領域が見出されなかった。しかし、ヒト血清中に β 1,3-N-アセチル
 グルコサミニル転移酵素活性が検出されることが報告されていることから (Huma
 n Serum Contains N-Acetylactosamine: β 1,3- N-Acetylglucosaminyltransfe
 rase Activity. Hosomi, O., Takeya, A., and Kogure, T. J. Biochem.95, 16
 55-1659(1984))、おそらくこのORFは膜貫通領域が無い分泌型酵素であると考え
 られた。

【0025】

この配列番号8によるORFとそれがコードするアミノ酸が実際に存在し、機能
 している (=発現している) ものであることを示すため、RT-PCRと、PCR増幅産
 物の制限酵素による確認およびPCR増幅産物の配列のダイレクトシーケンシン
 グ (通常の方法) によるmRNAの確認を行った。その結果上記理論上のORFが確かに
 存在し、実際に機能していることが確認された。

【0026】

また、上述のように、糖転移酵素は通常2型の膜貫通タンパク質であることが
 知られているが、配列番号8のアミノ酸配列のN末側に疎水性領域が無く、一般
 的な糖転移酵素とは異なっていると考えられた。そこで、N末側に疎水性領域 (膜
 貫通領域) を持つスプライシングバリエーションがさらに存在するか否か、5'-
 側の核酸配列 (=アミノ酸配列のN末端側) について解析を行なった。

【0027】

まず、Human stomach MarathonReady cDNA (クロンテック社)を鋳型として5'-RACE (Rapid amplification of cDNA ends) を行なった。具体的には、Marathon cDNA付属のAP1プライマーと (DNA断片の両側にAP1、さらにその両内側にAP2のアダプターがついている)、見出した配列部分に設定したプライマーbeta3GnT-7 RACE-5 (5'- GACCG ACTTG ACAAC CACCA GCA -3') でPCR (94℃60秒、94℃30秒-72℃3分を5サイクル、94℃30秒-70℃3分を5サイクル、94℃-68℃3分を25サイクル) を行い、そのDNA産物についてさらに、Marathon cDNA付属のAP2プライマーと、配列部分に設定したプライマーbeta3GnT-7RACE-4 (5' GTAGA CATCG CCG CT GCACT TCT -3') でnested PCR (94℃60秒、94℃30秒-72℃3分を5サイクル、94℃30秒-70℃3分を5サイクル、94℃-68℃3分を15サイクル) を行なった。これをpGEMeasy(クロンテック社)にクローニングして塩基配列を決定した。その結果、先に見出した配列番号6の開始コドンより上流部分の配列が得られ、アミノ酸配列にすると膜貫通領域が認められた。しかし、この膜貫通領域の配列近傍の5'-側の核酸配列を解析したが、ORFの開始点は認められなかった。

【 0 0 2 8 】

そこで、beta3GnT-7を含むヒトゲノム配列AC017104を遺伝子領域解析ソフトのGeneScan、HMMgene等を用いて翻訳領域を解析した。その結果、開始コドンを含み、11塩基 (約3アミノ酸) の第一エクソン (AC017104の塩基番号4331-4341) が予測された。そこで、開始コドンより前の部分にプライマーを設計してPCRを行い、予測された領域がトランスクリプトとして存在するかどうか確認することにした。

【 0 0 2 9 】

具体的には、プライマーとしてbeta3GnT-7RACE-8(5'- GCCCA GAGCT GCGAG CCG CT -3') (AC017104における4278-4300) とCB-638(5'- GCACA TGCCC AGAAA GAC GT CG-3') ((AC017104における7224-7245) 、鋳型としてHuman leukocyte Marathon-Ready cDNAおよびLA-Taq(TaKaRa)を用いてPCR (95℃30秒、60℃30秒、72℃60秒で30サイクル)を行なった。その結果、1046塩基の増幅産物が得られた。PCR増幅産物を精製してシーケンスを行ってこの配列を検証したところ、上記翻訳領域の解析で予測されたとおり、第1エクソンの3'側 (

塩基番号4341) が下流の塩基番号6258につながっていることが判明した。そこでさらに配列番号6、7と、この結果を組み合わせる配列番号5に示す1206の核酸および配列番号9に示す401のアミノ酸が得られた。この配列番号5は、配列番号8(配列番号6と配列番号7の合成)の塩基配列に上流部分の219塩基(73アミノ酸)((AC017104における4331-4341と6258-6465)付加したもので、塩基番号4342-6257はスプライスされたと考えられた。配列番号5は膜貫通領域(AC017104の塩基番号6265-6322)を含むため、配列番号5と配列番号8は同じ活性を持つ酵素の膜貫通型と分泌型であると考えられた。

【0030】

2. beta3GnT-7の発現ベクターへの挿入

beta3GnT-7の活性を調べるためにbeta3GnT-7を昆虫細胞内で発現させた。活性を確認するには配列番号9の少なくとも他のファミリー遺伝子と比較的ホモロジーが保たれている119番アミノ酸からC末端までの活性領域を発現させれば十分であると考えられるが、ここではbeta3GnT-7(配列番号9)の75番アミノ酸からC末端までの活性領域を発現させることとした。

【0031】

そこでインビトロジェン社のGatewayシステムのpFastBacに組み込み、さらにインビトロジェン社のBac-to-Bacシステムによるバクミドを作成した。

【0032】

① エントリークローンの作成

beta3GnT-7S プライマー(5'- GGGGA CAAGT TTGTA CAAAA AAGCA GGCTT Cgcct ctcag gggcc ccagg cct- 3')とbeta3GnT-7Aプライマー5'- GGGGA CCACT TTGTA CAGA AAGCT GGGTC catgg gggct cagga gcaag tgcc-3') (大文字は後述するGATEWAY用の付加配列attLである)、鋳型にはスクリーニングによって得られたcDNAクローンとPCRによって得られたDNA断片より生成したbeta3GnT-7クローン(理論上のORF配列を有するクローン)のDNAを用いてPCRを行い、増幅産物を得た。

【0033】

この産物をBP クロナーゼ 反応によってpDONR201へ組み込み、「エントリークローン」を作成した。反応は目的とするDNA断片5 μ l、pDONR201 1 μ l (150ng)、

反応緩衝液2 μ l、BP クロナーゼ mix 2 μ lを25℃で1時間インキュベートして行った。プロテイナーゼKを1 μ l加えて37℃10分おき反応を終了させた。

【0034】

その後上記mix全量 (11 μ l) をコンピテントセル (大腸菌DH5 α) 100 μ lと混合し、ヒートショック法の後、カナマイシンを含むLBプレートにまいた。翌日コロニーをとり、直接PCRで目的DNAを確認した。さらに確実を期するためシーケンシングによりDNA配列の確認をした後、ベクター (pDONR-beta3GnT-7) を抽出・精製した。

【0035】

②発現クローンの作成

上記エントリークローンは挿入部位の両側にラムダファージが大腸菌から切り出される際の組換え部位であるattLを持つもので、LRクロナーゼ (ラムダファージの組換え酵素Int、IHF、Xisを混合したもの) とデステイネーションベクターと混合することで、挿入部位がデステイネーションベクターに移り、発現クローンが作成される。具体的工程は以下のとおりである。

【0036】

まずエントリークローン1 μ l、pFBIFを0.5 μ l (75ng)、LR反応緩衝液2 μ l、TE4.5 μ l、LR クロナーゼmix 2 μ lを25℃で1時間反応させ、プロテイナーゼ K を1 μ l加えて37℃10分インキュベートして反応を終了させた (この組換え反応でpFBIF-beta3GnT-7 が生成される)。pFBIF は、pFastBac1にIg κ シグナル配列 (MHFQVQIFSFLLISASVIMSRG) と精製用のFLAGペプチド (DYKDDDDK) を入れたもので、Ig κ シグナル配列は発現タンパク質を分泌型にするため、FLAGペプチドは精製のため挿入したものである。FLAGペプチドはOT3 (5'-gatca tgcat ttcca agtgc agatt ttcag cttcc tgcta atcag tgcct cagtc ataata gtcac gtgga gatta caagg acgac gatga caag-3') を鋳型とし、プライマーOT20 (5'-cgggatccat gcattttcaa gtgcag-3') と、OT21 (5'-ggaat tcttgt catcg tcgtc cttg-3') によって得られたDNA断片をBam H1 とEco R1 で挿入した。さらに、Gateway配列を挿入するため、Gateway Vector Conversion System (インビトロジェン社) を用いてConversion cassetteを入れた。

【0037】

その後上記混合液全量 ($11\mu\text{l}$) をコンピテントセル (大腸菌DH5 α) $100\mu\text{l}$ と混合し、ヒートショック法の後、アンピシリンを含むLBプレートにまいた。翌日コロニーをとり、直接PCRで目的DNAを確認し、ベクター (pFBIF-beta3GnT-7) を抽出・精製した。

【0038】

③ Bac-to-Bacシステムによるバクミドの作成

続いてBac-to-Bacシステム (インビトロジェン社) を用いて上記 pFBIF-と pFastBacとの間で組換えをさせ、昆虫細胞中で増殖可能なバクミド (Bacmid) にG10その他の配列を挿入した。このシステムはTn7の組換え部位を利用して、バクミドを含む大腸菌 (DH10BAC) に目的遺伝子を挿入させたpFastBacを導入するだけで、ヘルパープラスミドから産生される組換えタンパク質によって目的とする遺伝子がバクミドへととりこまれるというものである。またバクミドにはlacZ遺伝子が含まれており、古典的な青 (挿入なし) - 白コロニー (挿入あり) による選択が可能である。

【0039】

即ち、上記精製ベクター (pFBIF-beta3GnT-7) をコンピテントセル (大腸菌DH10BAC) $50\mu\text{l}$ と混合し、ヒートショック法の後、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、Blue-gal、及びIPTGを含むLBプレートにまき、翌日白い単独コロニーをさらに培養し、バクミドを回収した。

【0040】

3. バクミドの昆虫細胞への導入

上記白コロニーから得られたバクミドに目的配列が挿入していることを確認した後、このバクミドを昆虫細胞Sf21 (インビトロジェン社より市販) に導入した。即ち35mmのシャーレにSf21 細胞 9×10^5 細胞/2ml (抗生物質を含むSf-900SFM (インビトロジェン社) を加え、27°Cで1時間培養して細胞を接着した。(Solution A) 精製したバクミドDNA $5\mu\text{l}$ に抗生物質を含まないSf-900SFM (インビトロジェン社) $100\mu\text{l}$ 加えた。(Solution B) CellFECTIN Reagent (インビトロジェン社) $6\mu\text{l}$ に抗生物質を含まないSf-900SFM (インビトロジェン社) $100\mu\text{l}$ 加

えた。その後、Solution AおよびSolution Bを丁寧に混合して15～45分間、室温でインキュベートした。細胞が接着したことを確認して、培養液を吸引して抗生物質を含まないSf-900SFM(インビトロジェン社) 2mlを加えた。Solution AとSolution Bを混合して作製した溶液(lipid-DNA complexes)に抗生物質を含まないSf 900II 800 μ lを加えて丁寧に混和した。細胞から培養液を吸引し、希釈したlipid-DNA complexes溶液を細胞に加え、27℃で5時間インキュベーションした。その後、トランスフェクション混合物を除き、抗生物質を含むSf-900SFM(インビトロジェン社) 培養液2mlを加えて27℃で72時間インキュベーションした。トランスフェクションから72時間後にピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを3000rpm, 10分間遠心し、上清を別のチューブに保存した(この上清が一次ウイルス液となる)。

【0041】

T75培養フラスコにSf21細胞 1×10^7 細胞/20ml Sf-900SFM(インビトロジェン社)(抗生物質入り)を入れて、27℃で1時間インキュベートした。細胞が接着したら一次ウイルスを800 μ lを添加して、27℃で48時間培養した。48時間後にピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを3000rpm, 10分間遠心し、上清を別のチューブに保存する(この上清を二次ウイルス液とした)。

【0042】

さらに、T75培養フラスコにSf21細胞 1×10^7 細胞/20ml Sf-900SFM(インビトロジェン社)(抗生物質入り)を入れて、27℃で1時間インキュベートした。細胞が接着したら二次ウイルス液1000 μ lを添加して、27℃で72～96時間培養した。培養後にピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを3000rpm, 10分間遠心し、上清を別のチューブに保存した(この上清を三次ウイルス液とした)。加えて、100ml用スピナーフラスコにSf21細胞 6×10^5 細胞/ml濃度で100mlを入れ、三次ウイルス液を1 ml添加して27℃で約96時間培養した。培養後に、細胞及び培養液を回収した。これを3000rpm, 10分間遠心し、上清を別のチューブに保存した(この上清を四次ウイルス液とした)。

【0043】

一次から三次までのセルペレットをソニケーションし（ソニケーション緩衝液：20mM HEPES pH7.5、2 % Triton X-100（商品名））細胞粗抽出液を H_2O で20倍にし、常法によりSDS-PAGEによる電気泳動について抗FLAG M2-ペルオキシダーゼ（A-8592、SIGMA社）を用いてウエスタンブロッティングを行い、目的とするbeta3GnT-7タンパク質の発現を確認した。その結果約38-40kDaの位置を中心としてブロードに複数のバンド（糖鎖などの翻訳後修飾の違いによるものと考えられる）が検出、発現が確認された。

【0044】

4. beta3GnT-7のレジン精製

上記四次感染のFLAG-beta3GnT-7上清10mlに NaN_3 (0.05 %)、NaCl (150 mM)、 $CaCl_2$ (2 mM)、抗M1レジン (Sigma 社) (50 μ l)を混合し、4℃で一夜攪拌した。翌日遠心して（3000rpm 5分4℃）ペレットを回収し、2 mMの $CaCl_2 \cdot TBS$ を900 μ l加えて再度遠心分離（2000rpm 5分4℃）し、ペレットを200 μ l の1 mM $CaCl_2 \cdot TBS$ に浮遊させ活性測定サンプル（beta3GnT-7酵素液）とした。

【0045】

5. beta3GnT-7の受容体基質の探索

beta3GnT-7は、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素類および β 1,3-ガラクトース転移酵素類と比較して分子進化学的に解析した結果、 β 1,3-N-アセチルグルコサミニル転移酵素類に分類された。そこで、第一に供与体基質（donor substrate）としてUDP-GlcNAcを用いて検討した。

【0046】

以下の反応系を用いて、beta3GnT-7の受容体基質を調べた。下記反応液の「受容体基質」には、pNp- α -Glc、pNp- β -Glc、pNp- α -GlcNAc、pNp- β -GlcNAc、pNp- α -Gal、pNp- β -Gal、pNp- α -GalNAc、Bz- α -GalNAc、pNp- α -Xyl、pNp- β -Xyl、pNp- α -Fuc、Bz- α -Man、Bz- α -ManNAc、LacCer、GalCer type1、Bz- β -lactoside（すべてSigma社）およびGal β 1-4GlcNAc- α -pNp（トロントリサーチケミカル社）を用いてそれぞれが受容体として機能するかどうかを調べた。

【0047】

反応液（カッコ内は最終濃度）は受容体基質（10 nmol）、カコジル酸ナトリ

ウム緩衝液 (pH7.2) (50mM)、Triton CF-54(商品名) (0.4 %)、 MnCl_2 (10 mM)、UDP-GlcNAc(480 μM)、UDP- ^{14}C GlcNAc (175 nCi)、CDP-coline(5 mM)から成り、これにbeta3GnT-7酵素液を10 μl 加えて、さらに H_2O を加えて全量25 μl とした。

【 0 0 4 8 】

上記反応混合液を37℃で5時間反応させ、反応終了後、0.1M KClを200 μl 加え、軽く遠心後上清を取得した。10 mlのメタノールで1回洗浄後、10 mlの H_2O で2回洗浄して平衡化したSep-Pak plus C18 Cartridge(Waters)に該上清を通し、上清中の基質および生成物をカートリッジに吸着させた。10 mlの H_2O にて2回カートリッジを洗浄後、5 mlのメタノールで吸着した基質および生成物を溶出した。溶出液を40℃のヒートブロックにて加熱しながら、窒素ガスを吹き付け蒸発乾固させた。これに、メタノール20 μl を添加し、TLCプレート (HPTLC plate Silica gel 60: MERCK社製) にプロットし、クロロホルム: メタノール: 水 (0.2% CaCl₂含む) = 65: 35: 8の組成からなる展開溶媒を用いて展開した。TLCプレートの上端から5mmの所まで展開し、プレートを乾燥後、バイオ・イメージアナライザーFLA3000 (富士写真フィルム社製) を用いて生成物に取り込まれている放射線の量を測定した。

【 0 0 4 9 】

その結果、beta3GnT-7はBz- β -ラクトシドおよびGal β 1-4GlcNAc- α -pNpにGlcNAcを転移させる活性を有する β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素であること、すなわち、Gal β 1-4Glc(NAc)-Rの非還元末端のガラクトースにGlcNAcを転移する酵素であることが判明した。

【 0 0 5 0 】

6. beta3GnT-7の組織特異的発現の解析

Real Time PCR法 (Gibson, U. E., Heid, C. A., and Williams, P. M. (1996) Genome Res 6, 995-1001) で組織での発現および株化細胞での発現状態を調べた。材料として、ヒト組織cDNAは、Marathon cDNA (クロンテック社) を使用した。各種株化細胞は、常法に従い総RNAを抽出してcDNAを合成した。beta3GnT-7の検量線は、pDONRTM201 vector DNA にbeta3GnT-7遺伝子を組み込んだプラ

スミドを使用した。内因性の対照として恒常的に発現しているグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)) を用いた。GAPDHの検量線は、pCR2.1 (インビトロゲン社) にGAPDH遺伝子を組み込んだプラスミドを使用した。beta3GnT-7用のプライマーセットおよびプローブは、RT-beta3GnT-7-F2 ; 5' -TTCCTCAAGTGGCTGGACATC-3' , RT-beta3GnT-7-R2 ; 5' -GCCGGTCAGCCAGAAATTC-3' , プローブ ; 5' - Fam ACTGCCCCCAGTCCCCTTCA -MGB-3' を用いた。GAPDHのプライマーセットとプローブは、キット (Pre-Developed TaqMan (商品名) Assay Reagents Endogenous Human GAPDH (Applied Biosystems社)) を使用した。PCR条件は、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems社) を使用し、1 サイクル、50°C, 2 分間、続いて1 サイクル、95°C, 10 分間、そして50サイクル ; 95°C, 15秒-60°C, 1分間を行なった。PCR産物の定量はABI PRISM7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems社) を用いて測定した。G11の発現量は、恒常的に発現しているGAPDHの転写産物量で割ることによって標準化した。表1にヒト組織、表2に株化細胞の結果をまとめる。

【 0 0 5 1 】

【表1】

表1

組織名	beta3GnT-7/GAPDH
脳	0.01045
大脳皮質	0.04522
小脳	0.02345
胎児脳	0.02030
骨髄	0.01462
甲状腺	0.04084
胸腺	0.01274
脾臓	0.10108
白血球	0.07876
心臓	0.00956
骨格筋	0.00071
肺	0.12146
肝臓	0.02299
食道	0.00605
胃	0.26922
小腸	0.09333
大腸	0.07630
膵臓	0.27317
腎臓	0.01161
副腎	0.15069
乳腺	0.02560
子宮	0.07747
胎盤	0.18763
卵巣	0.11465
精巣	0.05323

【0052】

beta3GnT-7の高発現組織は、膵臓、胃、胎盤、副腎であり、中発現組織は、大腸、白血球、肺、卵巣、小腸、脾臓、精巣、子宮、大脳皮質であった。それ以外の組織では発現量が比較的低いものであった。

【0053】

【表2】

表2

細胞名 (由来)	beta3GnT-7/GAPDH
GOTO (神経芽腫)	0.00012
SCCH-26 (神経芽腫)	0.00137
T98G (神経膠芽腫)	0.00032
U251 (神経膠芽腫)	0.00023
Leukemia (前骨髄芽球性白血病)	0.35660
Melanoma (皮膚)	0.01255
HL-60 (前骨髄芽球性白血病)	0.17663
K562 (白血病)	0.00038
U937 (単球)	0.01617
Daudi (B 細胞(Burkitt's))	0.00437
PC-1 (肺)	0.00000
EBC-1 (肺)	0.00121
PC-7 (肺)	0.00017
HepG2 (肝臓)	0.01199
A431 (食道)	0.01031
MKN45 (胃)	0.00027
KATOIII (胃)	0.03964
HSC43 (胃)	0.00031
Colo205 (大腸)	0.00278
HCT15 (大腸)	0.00193
LSC (大腸)	0.00003
LSB (大腸)	0.00128
SW480 (大腸)	0.00045
SW1116 (大腸)	0.13076
Capan-2 (膵臓)	0.03664
PA-1 (子宮)	0.00290

【 0 0 5 4 】

株化細胞でのbeta3GnT-7の発現は、正常組織に比べると低下していた。前骨髄芽球性白血病由来の細胞であるHL60細胞および大腸由来のSW1116細胞においては、発現レベルが高かった。

【 0 0 5 5 】

これらのことから、癌化などにより細胞の分化の程度が変化した場合、beta3GnT-7の発現量が変化することが容易に考えられ、beta3GnT-7の発現量の変化を調

ることにより、病気の診断に利用できる可能性が考えられた。また、beta3GnT-7には、記載したように開始点が2つ存在する可能性があり、スプライシングバリエーションの変化を調べることによって細胞の分化状態、病的な変化を調べられる可能性もある。

【0056】

【発明の効果】

本発明により、Gal β 1-4 GlcまたはGal β 1-4 GlcNAc-基の非還元末端にN-アセチルグルコサミンを β -1,3結合で転移する活性を有する酵素及びそれをコードする核酸が初めて提供された。本発明の酵素は、糖タンパク質の糖鎖の修飾、糖脂質の糖鎖の修飾や、糖類の合成に用いることができる。また、該酵素遺伝子の測定に用いることができる測定用核酸が初めて提供された。

【0057】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY
JAPAN GENOME SOLUTIONS INC.

<120> Novel acetylglucosamine transferase and nucleic acid encoding the
same

<130> 01742

<160>

【0058】

<210> 1

<211> 283

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Phe Pro Met Leu Leu Asn His Pro Glu Lys Cys Arg Gly Asp Val

1

5

10

15

Tyr Leu Leu Val Val Val Lys Ser Val Ile Thr Gln His Asp Arg Arg

20

25

30

Glu Ala Ile Arg Gln Thr Trp Gly Arg Glu Arg Gln Ser Ala Gly Gly

35

40

45

Gly Arg Gly Ala Val Arg Thr Leu Phe Leu Leu Gly Thr Ala Ser Lys

50

55

60

Gln Glu Glu Arg Thr His Tyr Gln Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Asp Arg

65

70

75

80

Leu Tyr Gly Asp Ile Leu Gln Trp Gly Phe Leu Asp Thr Phe Phe Asn

85

90

95

Leu Thr Leu Lys Glu Ile His Phe Leu Lys Trp Leu Asp Ile Tyr Cys

100

105

110

Pro His Val Pro Phe Ile Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn

115

120

125

Pro Thr Asn Leu Leu Glu Phe Leu Ala Asp Arg Gln Pro Gln Glu Asn

130

135

140

Leu Phe Val Gly Asp Val Leu Gln His Ala Arg Pro Ile Arg Arg Lys

145

150

155

160

Asp Asn Lys Tyr Tyr Ile Pro Gly Ala Leu Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr

165

170

175

Pro Pro Tyr Ala Gly Gly Gly Gly Phe Leu Met Ala Gly Ser Leu Ala

180

185

190

Arg Arg Leu His His Ala Cys Asp Thr Leu Glu Leu Tyr Pro Ile Asp

195

200

205

Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu Glu Val Leu Gly Val Gln Pro Thr

210

215

220

Ala His Glu Gly Phe Lys Thr Phe Gly Ile Ser Arg Asn Arg Asn Ser

225

230

235

240

Arg Met Asn Lys Glu Pro Cys Phe Phe Arg Ala Met Leu Val Val His

245

250

255

Lys Leu Leu Pro Pro Glu Leu Leu Ala Met Trp Gly Leu Val His Ser

260

265

270

Asn Leu Thr Cys Ser Arg Lys Leu Gln Val Leu

275

280

【 0 0 5 9 】

<210> 2

<211> 849

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

TAC TTC CCC ATG CTG CTG AAC CAC CCG GAG AAG TGC AGG GGC GAT GTC	48
Tyr Phe Pro Met Leu Leu Asn His Pro Glu Lys Cys Arg Gly Asp Val	
1 5 10 15	
TAC CTG CTG GTG GTT GTC AAG TCG GTC ATC ACG CAG CAC GAC CGC CGC	96
Tyr Leu Leu Val Val Val Lys Ser Val Ile Thr Gln His Asp Arg Arg	
20 25 30	
GAG GCC ATC CGC CAG ACC TGG GGC CGC GAG CGG CAG TCC GCG GGT GGG	144
Glu Ala Ile Arg Gln Thr Trp Gly Arg Glu Arg Gln Ser Ala Gly Gly	
35 40 45	
GGC CGA GGC GCC GTG CGC ACC CTC TTC CTG CTG GGC ACG GCC TCC AAG	192
Gly Arg Gly Ala Val Arg Thr Leu Phe Leu Leu Gly Thr Ala Ser Lys	
50 55 60	
CAG GAG GAG CGC ACG CAC TAC CAG CAG CTG CTG GCC TAC GAA GAC CGC	240
Gln Glu Glu Arg Thr His Tyr Gln Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Asp Arg	
65 70 75 80	
CTC TAC GGC GAC ATC CTG CAG TGG GGC TTT CTC GAC ACC TTC TTC AAC	288
Leu Tyr Gly Asp Ile Leu Gln Trp Gly Phe Leu Asp Thr Phe Phe Asn	
85 90 95	
CTG ACC CTC AAG GAG ATC CAC TTC CTC AAG TGG CTG GAC ATC TAC TGC	336
Leu Thr Leu Lys Glu Ile His Phe Leu Lys Trp Leu Asp Ile Tyr Cys	
100 105 110	
CCC CAC GTC CCC TTC ATT TTC AAA GGC GAC GAT GAC GTC TTC GTC AAC	384
Pro His Val Pro Phe Ile Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn	
115 120 125	
CCC ACC AAC CTG CTA GAA TTT CTG GCT GAC CGG CAG CCA CAG GAA AAC	432

Pro Thr Asn Leu Leu Glu Phe Leu Ala Asp Arg Gln Pro Gln Glu Asn
 130 135 140
 CTG TTC GTG GGC GAT GTC CTG CAG CAC GCT CGG CCC ATT CGC AGG AAA 480
 Leu Phe Val Gly Asp Val Leu Gln His Ala Arg Pro Ile Arg Arg Lys
 145 150 155 160
 GAC AAC AAA TAC TAC ATC CCG GGG GCC CTG TAC GGC AAG GCC AGC TAT 528
 Asp Asn Lys Tyr Tyr Ile Pro Gly Ala Leu Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr
 165 170 175
 CCG CCG TAT GCA GGC GGC GGT GGC TTC CTC ATG GCC GGC AGC CTG GCC 576
 Pro Pro Tyr Ala Gly Gly Gly Gly Phe Leu Met Ala Gly Ser Leu Ala
 180 185 190
 CGG CGC CTG CAC CAT GCC TGC GAC ACC CTG GAG CTC TAC CCG ATC GAC 624
 Arg Arg Leu His His Ala Cys Asp Thr Leu Glu Leu Tyr Pro Ile Asp
 195 200 205
 GAC GTC TTT CTG GGC ATG TGC CTG GAG GTG CTG GGC GTG CAG CCC ACG 672
 Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu Glu Val Leu Gly Val Gln Pro Thr
 210 215 220
 GCC CAC GAG GGC TTC AAG ACT TTC GGC ATC TCC CGG AAC CGC AAC AGC 720
 Ala His Glu Gly Phe Lys Thr Phe Gly Ile Ser Arg Asn Arg Asn Ser
 225 230 235 240
 CGC ATG AAC AAG GAG CCG TGC TTT TTC CGC GCC ATG CTC GTG GTG CAC 768
 Arg Met Asn Lys Glu Pro Cys Phe Phe Arg Ala Met Leu Val Val His
 245 250 255
 AAG CTG CTG CCC CCT GAG CTG CTC GCC ATG TGG GGG CTG GTG CAC AGC 816
 Lys Leu Leu Pro Pro Glu Leu Leu Ala Met Trp Gly Leu Val His Ser
 260 265 270
 AAT CTC ACC TGC TCC CGC AAG CTC CAG GTG CTC 849
 Asn Leu Thr Cys Ser Arg Lys Leu Gln Val Leu
 275 280

【0060】

<210> 3

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Gln Gly Pro Gln Ala Trp Asp Val Thr Thr Thr Asn Cys Ser

1 5 10 15

Ala Asn Ile Asn Leu Thr His Gln Pro Trp Phe Gln Val Leu Glu Pro

20 25 30

Gln Phe Arg Gln Phe Leu Phe Tyr Arg His Cys Arg Tyr Phe Pro Met

35 40 45

Leu Leu Asn His Pro Glu Lys Cys Arg Gly Asp Val Tyr Leu Leu Val

50 55 60

Val Val Lys Ser Val Ile Thr Gln His Asp Arg Arg Glu Ala Ile Arg

65 70 75 80

Gln Thr Trp Gly Arg Glu Arg Gln Ser Ala Gly Gly Gly Arg Gly Ala

85 90 95

Val Arg Thr Leu Phe Leu Leu Gly Thr Ala Ser Lys Gln Glu Glu Arg

100 105 110

Thr His Tyr Gln Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Asp Arg Leu Tyr Gly Asp

115 120 125

Ile Leu Gln Trp Gly Phe Leu Asp Thr Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys

130 135 140

Glu Ile His Phe Leu Lys Trp Leu Asp Ile Tyr Cys Pro His Val Pro

145 150 155 160

Phe Ile Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Pro Thr Asn Leu

165 170 175

Leu Glu Phe Leu Ala Asp Arg Gln Pro Gln Glu Asn Leu Phe Val Gly

180	185	190
Asp Val Leu Gln His Ala Arg Pro Ile Arg Arg Lys Asp Asn Lys Tyr		
195	200	205
Tyr Ile Pro Gly Ala Leu Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr Pro Pro Tyr Ala		
210	215	220
Gly Gly Gly Gly Phe Leu Met Ala Gly Ser Leu Ala Arg Arg Leu His		
225	230	235
His Ala Cys Asp Thr Leu Glu Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu		
245	250	255
Gly Met Cys Leu Glu Val Leu Gly Val Gln Pro Thr Ala His Glu Gly		
260	265	270
Phe Lys Thr Phe Gly Ile Ser Arg Asn Arg Asn Ser Arg Met Asn Lys		
275	280	285
Glu Pro Cys Phe Phe Arg Ala Met Leu Val Val His Lys Leu Leu Pro		
290	295	300
Pro Glu Leu Leu Ala Met Trp Gly Leu Val His Ser Asn Leu Thr Cys		
305	310	315
Ser Arg Lys Leu Gln Val Leu		

325

【 0 0 6 1 】

<210> 4

<211> 981

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

GCC TCT CAG GGG CCC CAG GCC TGG GAC GTG ACC ACC ACT AAC TGC TCA 48

Ala Ser Gln Gly Pro Gln Ala Trp Asp Val Thr Thr Thr Asn Cys Ser

1

5

10

15

GCC AAT ATC AAC TTG ACC CAC CAG CCC TGG TTC CAG GTC CTG GAG CCG 96

Ala Asn Ile Asn Leu Thr His Gln Pro Trp Phe Gln Val Leu Glu Pro	
20 25 30	
CAG TTC CGG CAG TTT CTC TTC TAC CGC CAC TGC CGC TAC TTC CCC ATG	144
Gln Phe Arg Gln Phe Leu Phe Tyr Arg His Cys Arg Tyr Phe Pro Met	
35 40 45	
CTG CTG AAC CAC CCG GAG AAG TGC AGG GGC GAT GTC TAC CTG CTG GTG	192
Leu Leu Asn His Pro Glu Lys Cys Arg Gly Asp Val Tyr Leu Leu Val	
50 55 60	
GTT GTC AAG TCG GTC ATC ACG CAG CAC GAC CGC CGC GAG GCC ATC CGC	240
Val Val Lys Ser Val Ile Thr Gln His Asp Arg Arg Glu Ala Ile Arg	
65 70 75 80	
CAG ACC TGG GGC CGC GAG CGG CAG TCC GCG GGT GGG GGC CGA GGC GCC	288
Gln Thr Trp Gly Arg Glu Arg Gln Ser Ala Gly Gly Gly Arg Gly Ala	
85 90 95	
GTG CGC ACC CTC TTC CTG CTG GGC ACG GCC TCC AAG CAG GAG GAG CGC	336
Val Arg Thr Leu Phe Leu Leu Gly Thr Ala Ser Lys Gln Glu Glu Arg	
100 105 110	
ACG CAC TAC CAG CAG CTG CTG GCC TAC GAA GAC CGC CTC TAC GGC GAC	384
Thr His Tyr Gln Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Asp Arg Leu Tyr Gly Asp	
115 120 125	
ATC CTG CAG TGG GGC TTT CTC GAC ACC TTC TTC AAC CTG ACC CTC AAG	432
Ile Leu Gln Trp Gly Phe Leu Asp Thr Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys	
130 135 140	
GAG ATC CAC TTC CTC AAG TGG CTG GAC ATC TAC TGC CCC CAC GTC CCC	480
Glu Ile His Phe Leu Lys Trp Leu Asp Ile Tyr Cys Pro His Val Pro	
145 150 155 160	
TTC ATT TTC AAA GGC GAC GAT GAC GTC TTC GTC AAC CCC ACC AAC CTG	528
Phe Ile Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Pro Thr Asn Leu	
165 170 175	

CTA GAA TTT CTG GCT GAC CGG CAG CCA CAG GAA AAC CTG TTC GTG GGC	576
Leu Glu Phe Leu Ala Asp Arg Gln Pro Gln Glu Asn Leu Phe Val Gly	
180 185 190	
GAT GTC CTG CAG CAC GCT CGG CCC ATT CGC AGG AAA GAC AAC AAA TAC	624
Asp Val Leu Gln His Ala Arg Pro Ile Arg Arg Lys Asp Asn Lys Tyr	
195 200 205	
TAC ATC CCG GGG GCC CTG TAC GGC AAG GCC AGC TAT CCG CCG TAT GCA	672
Tyr Ile Pro Gly Ala Leu Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr Pro Pro Tyr Ala	
210 215 220	
GGC GGC GGT GGC TTC CTC ATG GCC GGC AGC CTG GCC CGG CGC CTG CAC	720
Gly Gly Gly Gly Phe Leu Met Ala Gly Ser Leu Ala Arg Arg Leu His	
225 230 235 240	
CAT GCC TGC GAC ACC CTG GAG CTC TAC CCG ATC GAC GAC GTC TTT CTG	768
His Ala Cys Asp Thr Leu Glu Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu	
245 250 255	
GGC ATG TGC CTG GAG GTG CTG GGC GTG CAG CCC ACG GCC CAC GAG GGC	816
Gly Met Cys Leu Glu Val Leu Gly Val Gln Pro Thr Ala His Glu Gly	
260 265 270	
TTC AAG ACT TTC GGC ATC TCC CGG AAC CGC AAC AGC CGC ATG AAC AAG	864
Phe Lys Thr Phe Gly Ile Ser Arg Asn Arg Asn Ser Arg Met Asn Lys	
275 280 285	
GAG CCG TGC TTT TTC CGC GCC ATG CTC GTG GTG CAC AAG CTG CTG CCC	912
Glu Pro Cys Phe Phe Arg Ala Met Leu Val Val His Lys Leu Leu Pro	
290 295 300	
CCT GAG CTG CTC GCC ATG TGG GGG CTG GTG CAC AGC AAT CTC ACC TGC	960
Pro Glu Leu Leu Ala Met Trp Gly Leu Val His Ser Asn Leu Thr Cys	
305 310 315 320	
TCC CGC AAG CTC CAG GTG CTC	981
Ser Arg Lys Leu Gln Val Leu	

325

【0062】

<210> 5

<211> 1206

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atg tcg ctg tgg aag aaa acc gtc tac cgg agt ctg tgc ctg gcc ctg	48
Met Ser Leu Trp Lys Lys Thr Val Tyr Arg Ser Leu Cys Leu Ala Leu	
1 5 10 15	
gcc ctg ctc gtg gcc gtg acg gtg ttc caa cgc agt ctc acc cct ggt	96
Ala Leu Leu Val Ala Val Thr Val Phe Gln Arg Ser Leu Thr Pro Gly	
20 25 30	
cag ttt ctg cag gag cct ccg cca ccc acc ctg gag cca cag aag gcc	144
Gln Phe Leu Gln Glu Pro Pro Pro Pro Thr Leu Glu Pro Gln Lys Ala	
35 40 45	
cag aag cca aat gga cag ctg gtg aac ccc aac aac ttc tgg aag aac	192
Gln Lys Pro Asn Gly Gln Leu Val Asn Pro Asn Asn Phe Trp Lys Asn	
50 55 60	
ccg aaa gat gtg gct gcg ccc acg ccc atg gcc tct cag ggg ccc cag	240
Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro Thr Pro Met Ala Ser Gln Gly Pro Gln	
65 70 75 80	
gcc tgg gac gtg acc acc act aac tgc tca gcc aat atc aac ttg acc	288
Ala Trp Asp Val Thr Thr Thr Asn Cys Ser Ala Asn Ile Asn Leu Thr	
85 90 95	
cac cag ccc tgg ttc cag gtc ctg gag ccg cag ttc cgg cag ttt ctc	336
His Gln Pro Trp Phe Gln Val Leu Glu Pro Gln Phe Arg Gln Phe Leu	
100 105 110	
ttc tac cgc cac tgc cgc tac ttc ccc atg ctg ctg aac cac ccg gag	384

Phe Tyr Arg His Cys Arg Tyr Phe Pro Met Leu Leu Asn His Pro Glu	
115 120 125	
aag tgc agg ggc gat gtc tac ctg ctg gtg gtt gtc aag tcg gtc atc	432
Lys Cys Arg Gly Asp Val Tyr Leu Leu Val Val Val Lys Ser Val Ile	
130 135 140	
acg cag cac gac cgc cgc gag gcc atc cgc cag acc tgg ggc cgc gag	480
Thr Gln His Asp Arg Arg Glu Ala Ile Arg Gln Thr Trp Gly Arg Glu	
145 150 155 160	
cgg cag tcc gcg ggt ggg ggc cga ggc gcc gtg cgc acc ctc ttc ctg	528
Arg Gln Ser Ala Gly Gly Gly Arg Gly Ala Val Arg Thr Leu Phe Leu	
165 170 175	
ctg ggc acg gcc tcc aag cag gag gag cgc acg cac tac cag cag ctg	576
Leu Gly Thr Ala Ser Lys Gln Glu Glu Arg Thr His Tyr Gln Gln Leu	
180 185 190	
ctg gcc tac gaa gac cgc ctc tac ggc gac atc ctg cag tgg ggc ttt	624
Leu Ala Tyr Glu Asp Arg Leu Tyr Gly Asp Ile Leu Gln Trp Gly Phe	
195 200 205	
ctc gac acc ttc ttc aac ctg acc ctc aag gag atc cac ttc ctc aag	672
Leu Asp Thr Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Glu Ile His Phe Leu Lys	
210 215 220	
tgg ctg gac atc tac tgc ccc cac gtc ccc ttc att ttc aaa ggc gac	720
Trp Leu Asp Ile Tyr Cys Pro His Val Pro Phe Ile Phe Lys Gly Asp	
225 230 235 240	
gat gac gtc ttc gtc aac ccc acc aac ctg cta gaa ttt ctg gct gac	768
Asp Asp Val Phe Val Asn Pro Thr Asn Leu Leu Glu Phe Leu Ala Asp	
245 250 255	
cgg cag cca cag gaa aac ctg ttc gtg ggc gat gtc ctg cag cac gct	816
Arg Gln Pro Gln Glu Asn Leu Phe Val Gly Asp Val Leu Gln His Ala	
260 265 270	

cgg ccc att cgc agg aaa gac aac aaa tac tac atc ccg ggg gcc ctg	864
Arg Pro Ile Arg Arg Lys Asp Asn Lys Tyr Tyr Ile Pro Gly Ala Leu	
275 280 285	
tac ggc aag gcc agc tat ccg ccg tat gca ggc ggc ggt ggc ttc ctc	912
Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr Pro Pro Tyr Ala Gly Gly Gly Gly Phe Leu	
290 295 300	
atg gcc ggc agc ctg gcc cgg cgc ctg cac cat gcc tgc gac acc ctg	960
Met Ala Gly Ser Leu Ala Arg Arg Leu His His Ala Cys Asp Thr Leu	
305 310 315 320	
gag ctc tac ccg atc gac gac gtc ttt ctg ggc atg tgc ctg gag gtg	1008
Glu Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu Glu Val	
325 330 335	
ctg ggc gtg cag ccc acg gcc cac gag ggc ttc aag act ttc ggc atc	1056
Leu Gly Val Gln Pro Thr Ala His Glu Gly Phe Lys Thr Phe Gly Ile	
340 345 350	
tcc cgg aac cgc aac agc cgc atg aac aag gag ccg tgc ttt ttc cgc	1104
Ser Arg Asn Arg Asn Ser Arg Met Asn Lys Glu Pro Cys Phe Phe Arg	
355 360 365	
gcc atg ctc gtg gtg cac aag ctg ctg ccc cct gag ctg ctc gcc atg	1152
Ala Met Leu Val Val His Lys Leu Leu Pro Pro Glu Leu Leu Ala Met	
370 375 380	
tgg ggg ctg gtg cac agc aat ctc acc tgc tcc cgc aag ctc cag gtg	1200
Trp Gly Leu Val His Ser Asn Leu Thr Cys Ser Arg Lys Leu Gln Val	
385 390 395 400	
ctc tga	1206
Leu	

[0 0 6 3]

<210> 6

<211> 2228

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

cccagggcct cgccgccttc ccggtgcacc ccccgacctc ccccggtccc gcctcgggtg      60
gcggtcttccc tggaaccctt agggctggca gggccggatc cggagccctc cgtttcctcc      120
ccggagagct ggaccttggg tcacaccccc cagcctgcac ctaaggtgcc cctgtcttcc      180
tccaaccaca tgccccagca acctggggac cctatgggga aaatgtcgct ctatggggct      240
cagcctgcat tcacctggg gcctggacct gcaaccggac cagccctcag ggcaaccag      300
gcgtctccac gggctgcctg tctctcctgg caccctgtc ctccccctg gaggtcagcg      360
ccatctctct gctaggctgg ccctggaagg ccactctgct gtccccagag ctctcagccc      420
ccaggtctcc actggggagg gtggggcagg tgtcctggca gccccggag ggtgagatga      480
agagaggagg tccttcagga caggggctca ggccccaggg ctggggacga ccagcactcc      540
tggcagagag ctctaatttc tgcttccgaa atgggtgtgg accgggggtg ggggtggggg      600
gtctctgggc aagaagggtc cctcaagggc tggagctgca aatgtgcccc ctcccaggga      660
gtagagctgt agcctcatgt cttctaattg ggtgttatga gctggggatg ttaaggtagg      720
ggtgaggggc agtgccatgc tagagggtgct cactgcatcc ttgggcctcc atcaaccatg      780
agggctgtc tttgttgggt gagacagact ggagaagggg gaggagggcc agtcttctc      840
aggtcccaag ctcgagccac tctccaatgt gccccacatg tgatggagct cccgggcggc      900
acagaggatc agagggtgcc ctctcaatga ctctggctct gagtcaccta atgataccga      960
tacctactgc tgtgggtagg tacaccgag ggaaatgaaa ggcattgggg ttccaggcgt      1020
ggggaacagg gcagaggttt ccacctgagg ccctcctgtt aaggtagacag cattccccta      1080
actgtgcacc cgctgcctgg tactttatat agcactccaa tcctgtgttt tagccccatt      1140
tgggggaaga agaaatcgtg gctcagagtg gttgtaaacc actcattcag cttgtaagcg      1200
tcagggcctg attccacagt gctccttgag gagagggcag ggtgggagaa agaaagggca      1260
gggtgggaga ggaagcggga ccctaccctg acagcttagg gactccggga ctgagcctgt      1320
gcccagggtc acttgcccgt ctgggaccac ccagcctccc aaggggggcg ccaggagagc      1380
cctgggctca tcttttctct ctcctctgta ctgtccgtc tccccacag gaagaaaacc      1440
gtctaccgga gtctgtgcct ggccctggcc ctgctcgtgg ccgtgacggt gttccaacgc      1500
agtctcacc ctggtcagtt tctgcaggag cctccgccac ccacctgga gccacagaag      1560

```

gccagaagc caaatggaca gctggtgaac cccaacaact tctggaagaa cccgaaagat 1620
 gtggctgcgc ccacgccc atg gcc tct cag ggg ccc cag gcc tgg gac gtg 1671
 Met Ala Ser Gln Gly Pro Gln Ala Trp Asp Val
 1 5 10
 acc acc act aac tgc tca gcc aat atc aac ttg acc cac cag ccc tgg 1719
 Thr Thr Thr Asn Cys Ser Ala Asn Ile Asn Leu Thr His Gln Pro Trp
 15 20 25
 ttc cag gtc ctg gag ccg cag ttc cgg cag ttt ctc ttc tac cgc cac 1767
 Phe Gln Val Leu Glu Pro Gln Phe Arg Gln Phe Leu Phe Tyr Arg His
 30 35 40
 tgc cgc tac ttc ccc atg ctg ctg aac cac ccg gag aag tgc agg ggc 1815
 Cys Arg Tyr Phe Pro Met Leu Leu Asn His Pro Glu Lys Cys Arg Gly
 45 50 55
 gat gtc tac ctg ctg gtg gtt gtc aag tcg gtc atc acg cag cac gac 1863
 Asp Val Tyr Leu Leu Val Val Val Lys Ser Val Ile Thr Gln His Asp
 60 65 70 75
 cgc cgc gag gcc atc cgc cag acc tgg ggc cgc gag cgg cag tcc gcg 1911
 Arg Arg Glu Ala Ile Arg Gln Thr Trp Gly Arg Glu Arg Gln Ser Ala
 80 85 90
 ggt ggg ggc cga ggc gcc gtg cgc acc ctc ttc ctg ctg ggc acg gcc 1959
 Gly Gly Gly Arg Gly Ala Val Arg Thr Leu Phe Leu Leu Gly Thr Ala
 95 100 105
 tcc aag cag gag gag cgc acg cac tac cag cag ctg ctg gcc tac gaa 2007
 Ser Lys Gln Glu Glu Arg Thr His Tyr Gln Gln Leu Leu Ala Tyr Glu
 110 115 120
 gac cgc ctc tac ggc gac atc ctg cag tgg ggc ttt ctc gac acc ttc 2055
 Asp Arg Leu Tyr Gly Asp Ile Leu Gln Trp Gly Phe Leu Asp Thr Phe
 125 130 135
 ttc aac ctg acc ctc aag gag atc cac ttc ctc aag tgg ctg gac atc 2103

Phe Asn Leu Thr Leu Lys Glu Ile His Phe Leu Lys Trp Leu Asp Ile
 140 145 150 155
 tac tgc ccc cac gtc ccc ttc att ttc aaa ggc gac gat gac gtc ttc 2151
 Tyr Cys Pro His Val Pro Phe Ile Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe
 160 165 170
 gtc aac ccc acc aac ctg cta gaa ttt ctg gct gac cgg cag cca cag 2199
 Val Asn Pro Thr Asn Leu Leu Glu Phe Leu Ala Asp Arg Gln Pro Gln
 175 180 185
 gaa aac ctg ttc gtg ggc gat gtc ctg ca 2228
 Glu Asn Leu Phe Val Gly Asp Val Leu

190

195

【 0 0 6 4 】

<210> 7

<211> 848

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cag cag ctg ctg gcc tac gaa gac cgc ctc tac ggc gac atc ctg cag 48
 Gln Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Asp Arg Leu Tyr Gly Asp Ile Leu Gln
 1 5 10 15
 tgg ggc ttt ctc gac acc ttc ttc aac ctg acc ctc aag gag atc cac 96
 Trp Gly Phe Leu Asp Thr Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Glu Ile His
 20 25 30
 ttc ctc aag tgg ctg gac atc tac tgc ccc cac gtc ccc ttc att ttc 144
 Phe Leu Lys Trp Leu Asp Ile Tyr Cys Pro His Val Pro Phe Ile Phe
 35 40 45
 aaa ggc gac gat gac gtc ttc gtc aac ccc acc aac ctg cta gaa ttt 192
 Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Pro Thr Asn Leu Leu Glu Phe

50

55

60



210

tcctgagccc ccatggtatt ggggctggag ccacagtgcc caggcctagc ctttggtccc 736
 caaggggagg tggagggttg aggcctacgt gccactgggt gtggtgggt gcaggtagcc 796
 agaaaggac ctccctgtgt ggataattct aggaaactga ggcccaggaa cg 848

【 0 0 6 5 】

<210> 8

<211> 987

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ATG GCC TCT CAG GGG CCC CAG GCC TGG GAC GTG ACC ACC ACT AAC TGC 48

Met Ala Ser Gln Gly Pro Gln Ala Trp Asp Val Thr Thr Thr Asn Cys

1

5

10

15

TCA GCC AAT ATC AAC TTG ACC CAC CAG CCC TGG TTC CAG GTC CTG GAG 96

Ser Ala Asn Ile Asn Leu Thr His Gln Pro Trp Phe Gln Val Leu Glu

20

25

30

CCG CAG TTC CGG CAG TTT CTC TTC TAC CGC CAC TGC CGC TAC TTC CCC 144

Pro Gln Phe Arg Gln Phe Leu Phe Tyr Arg His Cys Arg Tyr Phe Pro

35

40

45

ATG CTG CTG AAC CAC CCG GAG AAG TGC AGG GGC GAT GTC TAC CTG CTG 192

Met Leu Leu Asn His Pro Glu Lys Cys Arg Gly Asp Val Tyr Leu Leu

50

55

60

GTG GTT GTC AAG TCG GTC ATC ACG CAG CAC GAC CGC CGC GAG GCC ATC 240

Val Val Val Lys Ser Val Ile Thr Gln His Asp Arg Arg Glu Ala Ile

65

70

75

80

CGC CAG ACC TGG GGC CGC GAG CGG CAG TCC GCG GGT GGG GGC CGA GGC 288

Arg Gln Thr Trp Gly Arg Glu Arg Gln Ser Ala Gly Gly Gly Arg Gly

85

90

95

GCC GTG CGC ACC CTC TTC CTG CTG GGC ACG GCC TCC AAG CAG GAG GAG	336
Ala Val Arg Thr Leu Phe Leu Leu Gly Thr Ala Ser Lys Gln Glu Glu	
100 105 110	
CGC ACG CAC TAC CAG CAG CTG CTG GCC TAC GAA GAC CGC CTC TAC GGC	384
Arg Thr His Tyr Gln Gln Leu Leu Ala Tyr Glu Asp Arg Leu Tyr Gly	
115 120 125	
GAC ATC CTG CAG TGG GGC TTT CTC GAC ACC TTC TTC AAC CTG ACC CTC	432
Asp Ile Leu Gln Trp Gly Phe Leu Asp Thr Phe Phe Asn Leu Thr Leu	
130 135 140	
AAG GAG ATC CAC TTC CTC AAG TGG CTG GAC ATC TAC TGC CCC CAC GTC	480
Lys Glu Ile His Phe Leu Lys Trp Leu Asp Ile Tyr Cys Pro His Val	
145 150 155 160	
CCC TTC ATT TTC AAA GGC GAC GAT GAC GTC TTC GTC AAC CCC ACC AAC	528
Pro Phe Ile Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Pro Thr Asn	
165 170 175	
CTG CTA GAA TTT CTG GCT GAC CGG CAG CCA CAG GAA AAC CTG TTC GTG	576
Leu Leu Glu Phe Leu Ala Asp Arg Gln Pro Gln Glu Asn Leu Phe Val	
180 185 190	
GGC GAT GTC CTG CAG CAC GCT CGG CCC ATT CGC AGG AAA GAC AAC AAA	624
Gly Asp Val Leu Gln His Ala Arg Pro Ile Arg Arg Lys Asp Asn Lys	
195 200 205	
TAC TAC ATC CCG GGG GCC CTG TAC GGC AAG GCC AGC TAT CCG CCG TAT	672
Tyr Tyr Ile Pro Gly Ala Leu Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr Pro Pro Tyr	
210 215 220	
GCA GGC GGC GGT GGC TTC CTC ATG GCC GGC AGC CTG GCC CGG CGC CTG	720
Ala Gly Gly Gly Gly Phe Leu Met Ala Gly Ser Leu Ala Arg Arg Leu	
225 230 235 240	
CAC CAT GCC TGC GAC ACC CTG GAG CTC TAC CCG ATC GAC GAC GTC TTT	768
His His Ala Cys Asp Thr Leu Glu Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Phe	

245	250	255	
CTG GGC ATG TGC CTG GAG GTG CTG GGC GTG CAG CCC ACG GCC CAC GAG			816
Leu Gly Met Cys Leu Glu Val Leu Gly Val Gln Pro Thr Ala His Glu			
260	265	270	
GGC TTC AAG ACT TTC GGC ATC TCC CGG AAC CGC AAC AGC CGC ATG AAC			864
Gly Phe Lys Thr Phe Gly Ile Ser Arg Asn Arg Asn Ser Arg Met Asn			
275	280	285	
AAG GAG CCG TGC TTT TTC CGC GCC ATG CTC GTG GTG CAC AAG CTG CTG			912
Lys Glu Pro Cys Phe Phe Arg Ala Met Leu Val Val His Lys Leu Leu			
290	295	300	
CCC CCT GAG CTG CTC GCC ATG TGG GGG CTG GTG CAC AGC AAT CTC ACC			960
Pro Pro Glu Leu Leu Ala Met Trp Gly Leu Val His Ser Asn Leu Thr			
305	310	315	320
TGC TCC CGC AAG CTC CAG GTG CTC TGA			987
Cys Ser Arg Lys Leu Gln Val Leu			

325

【 0 0 6 6 】

<210> 9

<211> 401

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ser Leu Trp Lys Lys Thr Val Tyr Arg Ser Leu Cys Leu Ala Leu

1

5

10

15

Ala Leu Leu Val Ala Val Thr Val Phe Gln Arg Ser Leu Thr Pro Gly

20

25

30

Gln Phe Leu Gln Glu Pro Pro Pro Pro Thr Leu Glu Pro Gln Lys Ala

35

40

45

Gln Lys Pro Asn Gly Gln Leu Val Asn Pro Asn Asn Phe Trp Lys Asn

50	55	60
Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro Thr Pro Met Ala Ser Gln Gly Pro Gln		
65	70	75
Ala Trp Asp Val Thr Thr Thr Asn Cys Ser Ala Asn Ile Asn Leu Thr		80
85	90	95
His Gln Pro Trp Phe Gln Val Leu Glu Pro Gln Phe Arg Gln Phe Leu		
100	105	110
Phe Tyr Arg His Cys Arg Tyr Phe Pro Met Leu Leu Asn His Pro Glu		
115	120	125
Lys Cys Arg Gly Asp Val Tyr Leu Leu Val Val Val Lys Ser Val Ile		
130	135	140
Thr Gln His Asp Arg Arg Glu Ala Ile Arg Gln Thr Trp Gly Arg Glu		
145	150	155
Arg Gln Ser Ala Gly Gly Gly Arg Gly Ala Val Arg Thr Leu Phe Leu		
165	170	175
Leu Gly Thr Ala Ser Lys Gln Glu Glu Arg Thr His Tyr Gln Gln Leu		
180	185	190
Leu Ala Tyr Glu Asp Arg Leu Tyr Gly Asp Ile Leu Gln Trp Gly Phe		
195	200	205
Leu Asp Thr Phe Phe Asn Leu Thr Leu Lys Glu Ile His Phe Leu Lys		
210	215	220
Trp Leu Asp Ile Tyr Cys Pro His Val Pro Phe Ile Phe Lys Gly Asp		
225	230	235
Asp Asp Val Phe Val Asn Pro Thr Asn Leu Leu Glu Phe Leu Ala Asp		
245	250	255
Arg Gln Pro Gln Glu Asn Leu Phe Val Gly Asp Val Leu Gln His Ala		
260	265	270
Arg Pro Ile Arg Arg Lys Asp Asn Lys Tyr Tyr Ile Pro Gly Ala Leu		
275	280	285

Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr Pro Pro Tyr Ala Gly Gly Gly Gly Phe Leu
 290 295 300
 Met Ala Gly Ser Leu Ala Arg Arg Leu His His Ala Cys Asp Thr Leu
 305 310 315 320
 Glu Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Phe Leu Gly Met Cys Leu Glu Val
 325 330 335
 Leu Gly Val Gln Pro Thr Ala His Glu Gly Phe Lys Thr Phe Gly Ile
 340 345 350
 Ser Arg Asn Arg Asn Ser Arg Met Asn Lys Glu Pro Cys Phe Phe Arg
 355 360 365
 Ala Met Leu Val Val His Lys Leu Leu Pro Pro Glu Leu Leu Ala Met
 370 375 380
 Trp Gly Leu Val His Ser Asn Leu Thr Cys Ser Arg Lys Leu Gln Val
 385 390 395 400
 Leu

【 0 0 6 7 】

<210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer for PCR
 <400> 10

cagcagctgc tggcctacga agac

24

【 0 0 6 8 】

<210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 11

gcacatgccc agaaagacgt cgtc

24

【 0 0 6 9 】

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 12

cgttcctggg cctcagtttc ctag

24

【 0 0 7 0 】

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 13

gaccgacttg acaaccacca gca

23

【 0 0 7 1 】

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 14

gtagacatcg cccctgcact tct

23

【 0 0 7 2 】

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 15

gcccagagct gcgagccgct

20

【 0 0 7 3 】

<210> 16

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 16

gcacatgccc agaaagacgt cg

22

【 0 0 7 4 】

<210> 17

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 17

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgcctctcag gggccccagg cct

53

【 0 0 7 5 】

<210> 18

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 18

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc catgggggct caggagcaag tgcc 54

【 0 0 7 6 】

<210> 19

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> template for PCR

<400> 19

gatcatgcat tttcaagtgc agattttcag cttcctgcta atcagtcct cagtcataat 60

gtcacgtgga gattacaagg acgacgatga caag 94

【 0 0 7 7 】

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 20

cgggatccat gcattttcaa gtgcag 26

【 0 0 7 8 】

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 21

ggaattcttg tcacgtcgt ccttg

25

【 0 0 7 9 】

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 22

ttcctcaagt ggctggacat c

21

【 0 0 8 0 】

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer for PCR

<400> 23

gccggtcagc cagaaattc

19

【 0 0 8 1 】

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide probe

<400> 24

actgccccca cgtccccttc a

21

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 Gal β 1-4 Glc または Gal β 1-4 GlcNAc-基の非還元末端に N-アセチルグルコサミンを β -1,3結合で転移する活性を有する酵素及びそれをコードする核酸を提供すること。

【解決手段】 配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ配列に 1 若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ配列を有し、Gal β 1-4 Glc または Gal β 1-4 GlcNAc-基の非還元末端に N-アセチルグルコサミンを β -1,3結合で転移する活性を有するタンパク質を提供した。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-070996
受付番号	50200362156
書類名	特許願
担当官	藤居 建次 1409
作成日	平成14年 7月 5日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 3月14日
【手数料の表示】	
【納付金額】	10,500円

出願人履歴情報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日 2001年 4月 2日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関1-3-1

氏 名 独立行政法人産業技術総合研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [501029744]

1. 変更年月日	2001年 1月18日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都八王子市小宮町51番地
氏 名	株式会社ジェー・ジー・エス